

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2000-300273

(43)Date of publication of application : 31.10.2000

(51)Int.Cl.

C12N 15/09

A01H 1/00

A01H 1/06

C12N 5/10

//C12N 15/09

C12R 1:91)

(21)Application number : 11-115002

(71)Applicant : SAISHU JITSUYO GIJUTSU KENKYUSHO:KK

(22)Date of filing : 22.04.1999

(72)Inventor : ISHIGURO SUMIE
OKADA KIYOTAKA
ODA AKIKO

(54) GENE PARTICIPATING IN DEHISCENCE OF ANTHER

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject new gene having a specific base sequence, comprising a DNA having promoter activity, controlling anther dehiscence and pollen maturity, and e.g. useful for raising male sterility plants for producing F1 hybrid variety seeds.

SOLUTION: This gene is a new DNA expressed by a base sequence of the formula or a new DNA expressed e.g. by a base sequence where at least one base deletion, substitution or addition has occurred in a base sequence of the formula, having promoter activity and obtained by the site-specific mutagenesis of the DNA expressed by a base sequence of the formula. The gene controls anther dehiscence and pollen maturity, and is used for producing male sterility plants useful for producing F1 hybrid seeds, the fertility restoring of male sterility plants or the like. The DNA is obtained by isolation from a cDNA library of WS-ecotype *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.

Copyright © 2000 by JPO, Inc. All rights reserved. This document is a translation of the original Japanese patent application. The original Japanese patent application is filed with the Japanese Patent Office on 2000-04-22. The original Japanese patent application is filed with the Japanese Patent Office on 2000-04-22.

Copyright © 2000 by JPO, Inc. All rights reserved. This document is a translation of the original Japanese patent application. The original Japanese patent application is filed with the Japanese Patent Office on 2000-04-22. The original Japanese patent application is filed with the Japanese Patent Office on 2000-04-22.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

02.12.1999

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the
examiner's decision of rejection or application
converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

3138452

[Date of registration]

08.12.2000

[Number of appeal against examiner's decision of
rejection][Date of requesting appeal against examiner's decision
of rejection]

BEST AVAILABLE COPY

[Date of extinction of right]

Japanese Unexamined Patent Publication
No. 300273/2000 (*Tokukai* 2000-300273)

A. Relevance of the Above-identified Document

The following is a partial English translation of exemplary portions of non-English language information that may be relevant to the issue of patentability of the claims of the present application.

B. Translation of the Relevant Passages of the Document

See also the attached English Abstract.

[TECHNICAL FIELD]

The present invention relates to DAD1 (DEFECTIVE IN ANTHR DEHISCENCE 1) gene, and plants in which expression of DAD1 gene is suppressed. The DAD1 gene is a gene that controls dehiscence of anther and maturation of pollen. By suppressing expression of the DAD1 gene, male sterile plants can be produced whose floral organ structure is almost identical to that of the wild type. The fertility of the male sterile plants can be recovered by treatment with jasmonic acid or linolenic acid, so that self-fertilizing seeds can be produced. Therefore, no maintenance line is required and first filial generation plants can be produced.

...

[0006]

[PROBLEMS TO BE SOLVED BY THE INVENTION]

An object of the present invention is to provide a nuclear gene that controls dehiscence of anther and pollen maturation. The invention also provides a technique whereby expression of the nuclear gene is suppressed to control male sterility and male fertility and thereby introduce male sterility for all individuals making up a maternal plant population.

[0007]

[MEANS TO SOLVE THE PROBLEMS]

The inventors of the present invention diligently worked to solve the foregoing problems, and successfully produced, using a T-DNA tagging method, mutants (dad1) of *Arabidopsis thaliana* in which no dehiscence of anther occurs even when the plant forms flowers. The pollens of these mutants had lost the germinating ability and were male sterile. Treating the buds of dad1 mutants with jasmonic acid or linolenic acid caused the anther to dehisce in flowers that were formed after the treatment, with the result that self-fertilizing seeds were formed... Further, it was found that a plant with no anther dehiscence, like the dad1 mutants, could be produced if antisense DAD1 gene, ligated backward to the promoter of DAD1, were incorporated in the genomic DNA of a plant.

[0010]

In the fourth invention, the present invention relates to male sterile plants in which expression of DNA according to the foregoing second invention is suppressed. In the fifth invention, the present invention relates to a method for producing male sterile plants in which expression of DNA according to the foregoing second invention is suppressed. In the sixth invention, the present invention relates to a method for recovering fertility by treating the male sterile plants of the foregoing fourth invention with jasmonic acid, linolenic acid, or derivatives of these acids.

[EMBODIMENTS]

...

[0016]

(4) Fourth Invention

According to the fourth invention, there is provided male sterile plant in which expression of DNA according to the

second invention is suppressed. The type of plant is not particularly limited as long as it includes the DNA according to the second invention. For example, the plant may be *Brassicaceae*, *Poaceae*, *Asteraceae*, or *Chenopodiaceae*.

[0017]

The male sterile plants have the following features. First, the plant has traits almost identical to those of the wild type, except that the anther does not dehisce... The male sterile plants of the present invention have floral organs almost identical to those of the wild type. This helps attract bees, horse flies, and other pollinating insects, with the result that seed production is increased. Another feature of the male sterile plants is that the fertility of the plants can be recovered by treatment with jasmonic acid, linolenic acid. With these features, the male sterile plants of the present invention can easily produce self-fertilizing seeds and provide a homozygous population for male sterile genes...

[0018]

(5) Fifth Invention

According to the fifth invention, there is provided a method for suppressing expression of DNA according to the second invention. The method is not particularly limited. Preferable methods include, for example, the antisense method, cosuppression method, gene disruption tagging method, gene targeting method, and a method employing mutagens, as will be described later.

[0019]

i) Antisense Method

In the antisense method, the expression of DNA according to the second invention is suppressed by constructing a vector that includes a suitable promoter and DNA (antisense DNA) of the third invention placed downstream of the promoter,

and introducing the vector into a plant...

...

[0022]

ii) Cosuppression Method

In this method, a vector is constructed in which a gene of interest is placed downstream of the DNA (promoter) of the first invention, and the vector is introduced into a plant. The expression of DNA according to the second invention is suppressed by the resulting cosuppression...

[0023]

iii) Gene Disruption Tagging Method

In this method, the expression of DNA according to the second invention is suppressed by inserting T-DNA or transposon into the DNA of the second invention. A vector including T-DNA or transposon is introduced into a plant to prepare a group of mutant lines in which the T-DNA or transposon is randomly inserted into the genome. Then, genomic DNA is prepared from the plants of these mutant lines, and individuals with disrupted DAD1 gene are screened for by PCR. Alternatively, individuals with disrupted DAD1 can be selected by screening for mutants with no anther dehiscence, based on the phenotype of the mutated plants, or by treating the buds of the mutants with linolenic acid or jasmonic acid.

...

[0025]

iv) Gene Targeting Method

In this method, the expression of DNA according to the second invention is suppressed by knocking out the DNA of the second invention. This is achieved by inserting DNA into part of the DNA of the second invention by homologous recombination. For example, this can be carried out according to the method described in Kempin et al., Nature 389: 802-803, 1997).

Specifically, kanamycin gene or the like is introduced into the DNA of the second invention to construct a targeting vector, and the vector is introduced into a plant to cause homologous recombination and knock out the DNA of the second invention...

[0026]

v) Method employing Mutagens

In this method, the expression of DNA of the second invention is suppressed by treating a plant with mutagens and causing mutation in the DNA of the second invention. Specifically, plants of interest or their seeds are treated with mutagens, and individuals with disrupted DAD1 gene are screened for from M2 generation that was self-fertilized from the first generation (M1) treated with mutagens. For example, after treating several thousand plant individuals with mutagens, self-fertilizing seeds are collected. For each individual of the M1 generation, several seeds are planted and mutants with no dehiscence of anther are screened for. Then, the buds of the selected mutants are treated with linolenic acid or jasmonic acid to screen for individuals with disrupted DAD1 gene.

[0027]

The mutagen is not particularly limited as long as it can increase the mutation rate. Some of the examples include x-rays, γ-rays, ethyl methanesulfonate (EMS), and N-nitroso-N-methylurea (NMU)...

[0028]

(6) Sixth Invention

According to the sixth invention, there is provided a fertility recovering method in which the male sterile plant of the fourth invention is treated with jasmonic acid, linolenic acid, or derivatives of these acids.

...

[EXAMPLES]

...

[Example 5] Production of Male Sterile Plants (Method using Antisense DAD1 Gene)

(1) Construction of a Vector with Antisense DAD1 Gene

... The promoter region was amplified by PCR... The DAD1 translation region was amplified by PCR. The amplified fragments were inserted into pBluescriptII SK- (Stratagene) to obtain antisense DAD1 gene, in which the DAD1 translation region is ligated backward on the downstream side of the promoter region.

[0040]

The antisense DAD1 gene was then excised from the plasmid vector and inserted at ClaI and SacI sites of binary vector pGAH to construct binary plasmid pADAD1.

[0041]

(2) Transformation of *Arabidopsis thaliana*

The binary plasmid pADAD1 was introduced into *Agrobacterium tumefaciens* EHA101 strain, so as to transform *Arabidopsis thaliana* by vacuum infiltration...

[0042]

The transformed *Arabidopsis thaliana* did not show dehiscence of anther as in *dad1* (Figure 6, left-hand side), and no self-fertilizing seeds were formed. The unflowered buds of the transformants were soaked with an aqueous solution of 0.5 mM methyl jasmonate. The flowers that were formed after the treatment had dehiscence of anther, exposing pollens on the surface of the anther (Figure 6, right-hand side). When the pistils were pollinated with these pollens, self-fertilizing seeds were formed. It was therefore found that transformants with male sterility, similar to *dad1* mutants, could be produced by introducing the vector described in Example 5-(1).

[0043]

[Example 6] Production of Male Sterile Plants (Method using Promoter-GUS Gene Introduced Vector)

(1) Construction of Promoter-GUS Gene Introduced Vector)

pGDAD1-HS was excised with S_{ph}I, and the blunt ends were smoothed by klenow fragments. Then, the sequence was excised with HindIII to isolate a DNA fragment of 3512 bp. The DNA fragment was then ligated between HindIII and SmaI of the binary vector pBI101.2 (Clontec) to construct plasmid pBIDAD-H (Figure 7), in which GUS reporter gene is ligated to the promoter of DAD1 gene.

[0044]

(2) Transformation of *Arabidopsis thaliana*

pBIDAD1-H was introduced into *Agrobacterium tumefaciens* GV301 strain to transform *Arabidopsis thaliana* by vacuum infiltration, as in Example 5-(2). There were no phenotypic abnormalities in the majority of the transformed *Arabidopsis thaliana*... In some of the transformants, however, no dehiscence of anther occurred as in the dad1 mutants. The ability to dehisce was recovered by jasmonic acid treatment. The staining ability by X-Gluc was weaker in these individuals.

...

[EFFECTS OF THE INVENTION]

The present invention provides a nuclear gene that controls dehiscence of anther in plants. The invention also provides male sterile plants in which expression of the nuclear gene is suppressed. The male sterile plants have floral organs almost identical to those of the wild type, can recover fertility by treatment with jasmonic acid or the like. The male sterile plants are therefore highly useful for the production of F1 seeds.

(19)日本国特許庁 (J P) (12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号
特開2000-300273
(P2000-300273A)

(43)公開日 平成12年10月31日 (2000.10.31)

(5)Int.Cl.		FI		チロノド(参考)	
C12N 15/09	ZNA	C12N 15/00	ZNAA 2B030		
A01H 1/00		A01H 1/00	A 4B024		
			4B065		
C12N 5/10		C12N 5/00	C		
// (C12N 15/09	ZNA				

審査請求 有 請求項の数 6 OL (全 20 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平11-115002	(71)出願人	595017702 株式会社森種実用技術研究所 宮城県仙台市青葉区南五丁目6番地の3 石黒 遼郎 京都府京都市左京区北白川通分町 京都大 学大学院理学部生命科学専攻植物学系 岡田 清孝 京都府京都市左京区北白川通分町 京都大 学大学院理学部生命科学専攻植物学系 (74)代理人 100091096 弁護士 平本 祐輔 (外2名)
(22)出願日	平成11年4月22日 (1999.4.22)		

(54)【発明の名称】 薬の製剤に関与する遺伝子

(57)【要約】

【解決手段】 薬の製剤及び花粉の成熟を抑制する遺伝子、及びその遺伝子の発現が抑制されている遺伝性不妊植物、並びにその遺伝性不妊植物の雄性を回復する方法。
【効果】 その花芽が野生型に限りなく近く、また、ジャスモン酸等により雄性を回復させることのできるため、F1種子生産のために極めて有用な遺伝性不妊植物を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の(a)又は(b)の塩基配列により表され、プロモーター活性を有するDNA、

(a) 配列番号3に記載の塩基配列

(b) 配列番号3に記載の塩基配列において、1若しくは複数の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列であるDNA、

【請求項2】 以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードするDNA、

(a) 配列番号2に記載のアミノ酸配列により表されるタンパク質

(b) 配列番号2に記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列により表され、薬の製剤を抑制する機能を有するタンパク質

【請求項3】 請求項2記載のDNAと相補的な塩基配列により表されるDNA、

【請求項4】 請求項2記載のDNAの発現が抑制されていることを特徴とする遺伝性不妊植物、

【請求項5】 請求項2記載のDNAの発現を抑制することと特徴とする遺伝性不妊植物の作出方法、

【請求項6】 請求項4記載の遺伝性不妊植物をジャスモン酸、リノレン酸、又はそれらの誘導体で処理することと特徴とする雄性回復方法、

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、DAD1(DEFECTIVE 1、N ANOTHER DEFICIENCY 1)遺伝子、及び後述遺伝子の発現を抑制した植物に関する。DAD1遺伝子は薬の製剤及び花粉の成熟を抑制する遺伝子であり、DAD1遺伝子の発現を抑制すること、野生型に限りなく近い花芽構造を有する遺伝性不妊植物の作出を可能にする、作出された遺伝性不妊植物はジャスモン酸、リノレン酸処理により雄性を回復し、自殖種子を得ることができ、そのため、維持系統を必要とせず、一代雑種品種育成が可能となる。

【0002】

【従来の技術】 近年、多くの作物で雑種強勢(ヘテロシス)を利用した一代雑種(F1)品種の育成が進められている。このF1品種のメリットは、雑種強勢の発現により収量性、耐病性などの農業形質が優れたものとなること、異因子遺伝の農業形質の付与が容易なこと、均一性が高いこと、また、次世代で遺伝形質の分離が起こるため育成者の権利が守られることなどが挙げられる。

【0003】 F1品種においては、雑種第1代目の種子を多量に確保する必要がある。そのための技術として、遺伝的雄性不妊性を持つものを母親に使用することが行われてきた。この他に自家不妊性を利用する方法、雄花を人為的に除去する方法、人為的に交配する方法、などがあるが、これらの方法では利用できる植物種が限られている。遺伝的雄性不妊性を利用する方法が、最も汎用性に富んでいるため、F1種子を確保するために広く用いら

れてきた。

【0004】 遺伝的な雄性不妊性には核内遺伝子によって支配される雄性不妊性(GMS)と核内遺伝子と細胞質因子の両者が関与する細胞質雄性不妊性(CMS)の2種類がある。F1品種育成の際の課題においては、以下の理由からCMSが利用されてきた。CMSの場合、雄性不妊性を示すのは、その遺伝子についてホモ接合性の個体だけであり、ヘテロ接合性の個体は通常雄性を持つ。幼実的なF1種子の生産を行うためには、母親に用いる個体すべてが雄性不妊であることが求められるが、このことは、CMSを利用してF1種子を生産する場合に、母親に用いる個体すべてを雄性不妊性に関する遺伝子についてホモ接合性の個体にしなければならないことを意味する。しかし、CMSにおいては、それ自身の花粉が利用できないので自殖によるホモ接合性の個体を作り出すことができない。ヘテロ接合性の個体を自家受粉することにより、ホモ接合性の個体を作り出すことはできるが、この場合にはホモ接合性個体が1/4しか得られず、実用化できない。

【0005】 しかし、CMSにおいても、その遺伝子に関してホモ接合性の集団が得られる技術が開発されれば、これを利用してF1種子の生産も可能になる。実際、雄性不妊性のホモ接合性の個体を選択する方法などが考案され、一部では利用されているが、ホモ接合性の集団を育成する方法がなかった。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】 本発明の目的は、薬の製剤と花粉の成熟を抑制する後述遺伝子を提供すると共に、その遺伝子発現を抑制することによって、雄性不妊性と雄性可妊性を制御して、母親に使用する植物集団の個体全てが雄性不妊性となる技術を提供することである。

【0007】

【課題を解決するための手段】 本発明者は、上記の課題を解決すべく鋭意検討を重ねた結果、F-DNAタギング法により、開花後も薬の製剤が起らないシロイタナズナ(Arabidopsis thaliana)の突然変異体(dad1)の作出に成功した。この変異体の花粉は、発芽能を失った。雄性不妊性であった。dad1突然変異体の雄配子ジャスモン酸あるいはリノレン酸で処理すると、その後開花した花では薬の製剤が見られ、自殖種子を形成した。このdad1突然変異体より、F-DNA配列をもとにして、DAD1遺伝子のゲノミッククローンとcDNAクローンを単離した。単離したゲノミッククローンを植物導入ベクターに連結して、dad1変異体に形質転換したところ、再生植物体では薬の製剤、自殖種子の形成が見られ、野生型表現型に回復していた。この結果は、単離した遺伝子がDAD1遺伝子であることを示すものである。さらに、DAD1のプロモーターに逆向きに連結したアンチセンスDAD1遺伝子を植物ゲノムDNA中に組み込むことによって、dad1突然変異体同様に、薬の製剤の起らない植物体を作り出さ

とを見いだした。以上の知見に基づき、本発明は完成されたものである。

【0008】即ち、本発明の第一は、以下の(a)又は(b)の塩基配列により表され、プロモーター活性を有するDNAに関するものである。

(a) 配列番号3に記載の塩基配列

(b) 配列番号3に記載の塩基配列において、1若しくは複数の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列

【0009】本発明の第二は、以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードするDNAに関するものである。

(a) 配列番号2に記載のアミノ酸配列により表されるタンパク質

(b) 配列番号2に記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列により表され、薬の発現を制御する機能を有するタンパク質

【0010】本発明の第三は、上記第二発明のDNAと相補的な塩基配列により表されるDNAに関するものである。本発明の第四は、上記第二発明のDNAの発現を抑制することと特徴とする遺伝性不発植物に関するものである。本発明の第五は、上記第二発明のDNAの発現を抑制することと特徴とする遺伝性不発植物の作出方法に関するものである。本発明の第六は、上記第四の発明の遺伝性不発植物をジェノム、リノレン酸、又はそれらの誘導体で処理することと特徴とする遺伝性回復方法に関するものである。

【0011】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。

(1) 第一発明

第一発明のDNAは、プロモーター活性を有するDNAであって、配列番号3に記載の塩基配列又は配列番号3に記載の塩基配列において、1若しくは複数の塩基が欠失若しくは付加された塩基配列により表されるDNAとして、本発明の出願時に常用される技術、例えば、部位特異的突然変異誘発法 (Zoller et al., Nucleic Acid Res. 10:6487-6500, 1982) によって変異を生じさせたDNAや配列番号3に記載の塩基配列により表されるDNAと異なる塩基配列から単離されたDNAなどを示すことができる。

【0012】第一発明のDNAは、実施例記載の方法によっても得ることが出来るが、その塩基配列は既に決定されているので、この配列に基づきプライマーを合成し、この塩基配列を含むDNAを鋳型にPCRを行うことによっても得ることが出来る。使用するプライマーは、特に限定されない。鋳型として用いるDNAとしては、アラミスミドADH-15(このアラミスミドを含む菌株は、工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号PEH P-17299として寄託されている)を挙げることができる。

【0013】(2) 第二発明

第二発明のDNAは、配列番号2に記載のアミノ酸配列により表されるタンパク質、又は配列番号2に記載のアミノ酸配列において、一若しくは複数のアミノ酸配列が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列により表され、薬の発現を制御する機能を有するタンパク質をコードするDNAとして、本発明の出願時に常用される技術、例えば、部位特異的突然変異誘発法 (Zoller et al., Nucleic Acid Res. 10:6487-6500, 1982) によって変異を生じさせたDNAや配列番号2に記載のアミノ酸配列をコードするDNAと異なる塩基配列から単離されたDNAなどを示すことができる。

【0014】あるDNAが薬の発現を抑制する機能を持つかどうかは、そのDNAを、内発的DNAの発現が抑制された植物 (例えば、実施例2に記載した「dad1」) に導入し、それにより薬の発現が回復するかどうかを調べることにより判断できる。第二発明のDNAは、実施例記載の方法によっても得ることが出来るが、その塩基配列は既に決定されているので、この配列に基づきプライマーを合成し、この塩基配列を含むDNAを鋳型にPCRを行うことによっても得ることが出来る。

【0015】(3) 第三発明

第三発明のDNAは、上記第二発明のDNAと相補的な塩基配列により表される。第三発明のDNAは、実施例記載の方法によっても得ることが出来るが、その塩基配列は既に決定されているので、この配列に基づきプライマーを合成し、この塩基配列を含むDNAを鋳型にPCRを行うことによっても得ることが出来る。

【0016】(4) 第四発明

第四発明の遺伝性不発植物は、第二発明のDNAの発現が抑制されていることを特徴とするものである。植物の種類は、第二発明のDNAを有するものであれば特に限定されず、例えば、アラミスミド、イネ科、キク科、アカガ科の植物などを挙げることができる。

【0017】この遺伝性不発植物の特徴点としては、以下の2点を挙げることができる。一つは、薬が阻害しない他は、その形質は野生型のそれとほとんど変わりがない

点である。遺伝性不発性を利用したF₂採種は、例えば、アラミナ科野菜では数例しか報告がない。これは、従来の遺伝性不発系統の多くに花路の異常が見られるため、送粉昆虫が訪花せず授精量が少ないためである。本発明の遺伝性不発植物は、その花構造が野生型に限りなく近い。授精量の増大を図ることができ、他の植物の他の特徴、例えば、リノレン酸やジェノム酸などを処理することによってその特性を回復させることができる点である。

本発明の遺伝性不発植物は、このような性質から容易に自殖種子が得られ、遺伝性不発遺伝子も接合性の集団を容易に作製することが出来る。遺伝性不発植物は、例えば、後述する第五発明の作出方法に従って作出することができる。

【0018】(5) 第五発明

第五発明の作出方法は、第二発明のDNAの発現を抑制することと特徴とするものである。第二発明のDNAの発現を抑制する方法は、特に限定されないが、好ましい方法として、以下のアンチセンス法、コ・サブプレッジョン法、遺伝子破壊型タキシング法、ジーンターゲティング法、突然変異誘発法を利用する方法などを示すことができる。

【0019】(1) アンチセンス法

この方法は、真言アロモーターとその下流に配置された第三発明のDNA (アンチセンスDNA) とを含むベクターを構築し、それを植物に導入することにより、第二発明のDNAの発現を抑制する方法である。ここで使用するアロモーターとしては、第一発明のDNA (プロモーター) が好ましいが、他のプロモーターを用いても良い。他のアロモーターとしては、CaMV35Sプロモーターなどの公知の植物発現アロモーターを用いることができる。

【0020】ベクターの植物への導入は、植物細胞へ外来遺伝子を導入する際に常用する方法、例えば、アグロバクテリウムを用いた方法により行うことが出来る。アグロバクテリウムとしては、植物の外來遺伝子導入に常用されるものであれば特に限定されないが、例えば、*Agrobacterium tumefaciens* EHA101株 (Hood et al., J. Bacteriol. 168:1291-1301 1986) を用いることができる。

【0021】アロモーターと共に導入された第三発明のDNAは、植物内で第二発明のDNAに対するアンチセンス遺伝子としてではなく、即ち、第三発明のDNAの転写産物が、植物内にもともと存在する第二発明のDNAの転写産物と対合し、その転写を阻害し、その結果、第二発明のDNAの発現が抑制される。植物体に第三発明のDNAが導入されているかどうかは、植物体よりゲノムDNAを抽出し、サザンハイブリダイゼーションを行うことにより確認できる。

【0022】ii) コ・サブプレッジョン法

この方法は、第一発明のDNA (プロモーター) の下流に

任意の遺伝子を配置したベクターを構築し、これを植物に導入することにより、コ・サブプレッジョンを起こさせ、これにより第二発明のDNAの発現を抑制する方法である。第一発明のDNAの下流に連結する遺伝子は、特に限定されず、例えば、GUSレポーター遺伝子、第二発明のDNA等を使用することが出来る。ベクターの植物への導入は、上記のアンチセンス法と同様に行うことができる。

【0023】iii) 遺伝子破壊型タキシング法

この方法は、T-DNAまたはトランスポゾンで第二発明のDNAに挿入することにより、第二発明のDNAの発現を抑制する方法である。T-DNAやトランスポゾンを含むベクターを植物に導入することにより、T-DNAやトランスポゾンがゲノム中にランダムに挿入した突然変異系統群を作製する。これら系統群の植物体からゲノムDNAを調製し、PCR法を利用してDADの遺伝子破壊株をスクリーニングすることができる。あるいはこれらの系統群の植物体の発現を阻害して薬の発現を抑制しない変異株を選択し、置換リノレン酸やジェノム酸を処理することにより、DAD遺伝子破壊株を選択することが出来る。

【0024】T-DNAタキシングに用いるベクターは、特に限定されず、例えば、pBI101-16を使用することが出来る。また、トランスポゾンタキシングに使用することが出来る。トランスポゾンについては、特に限定されず、例えば、Ac-Ds系等のDNA型トランスポゾンや、レトロトランスポソンを使用することができる。

【0025】iv) ジーンターゲティング法

この方法は、相同組換えにより第二発明のDNAの一部に他のDNAを挿入し、第二発明のDNAをノックアウトすることにより第二発明のDNAの発現を抑制する方法である。このように第二発明のDNAをノックアウトする方法としては、例えば、Kempinらの方法 (Kempin et al., Nature 389:802-803, 1997) に従って行うことができる。即ち、第二発明のDNA内にカナマイシン遺伝子等を挿入したターゲティングベクターを作製し、これを植物に導入し、相同組換えを起こさせ、第二発明のDNAをノックアウトする。相同組換えが起こったかどうかは、PCRやサザンハイブリダイゼーションにより確認することができる。

【0026】v) 突然変異誘発法を利用する方法

この方法は、突然変異誘発剤を処理し、第二発明のDNAに突然変異を起こすことにより、第二発明のDNAの発現を抑制する方法である。突然変異の種子もしくは植物体に誘発剤を処理し、処理当 (M₁) を自殖した世代 (M₂) の植物体からDAD遺伝子破壊株を選択することが出来る。例えば、数千の個体の突然変異誘発剤で処理した後、これらの自殖種子を採種する。M₂世代1個体あたり数個の種子を圃場に植え付けて観察して薬の発現していない変異株を選択する。抜出した個体のゲノムにリノレン酸やジェノム酸を処理することにより、DAD遺伝子破壊株を

法)

(1) プロモーター-GUS遺伝子導入ベクターの構築
pMD19-SをS₁IIで切断し、末端をK₁en₁断片で平滑化
した。次にHindIIIで切断し、3512bpのDNA断片を単離し
た。このDNA断片をP₁ナリ-ベクター-p8101.2 (Clont
ec社)のHindIII部位とSalI部位の間に連結し、DAD1連
伝子のプロモーター-GUSレポーター遺伝子を連結した
プラスミドp8101-H (図7) を構築した。

(0044) (2) シロイタナズナ¹の形質転換
pMD19-HをAgrobacterium tumefaciens GV3101株に導
入し、実験例5-(2)と同様に、滅菌液 (vacuum inf
iltration) 法でシロイタナズナ (USエコタイプ、京都
大学大学院理学部植物学教室) に形質転換した。
形質転換体のシロイタナズナの一部では、表現型の異
常は見られなかった。これらの植物が花芽を取ってX-
Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronid
e、和光純薬) 溶液で染色したところ、花糸に強い染色
が観察された。一方、一部の形質転換体では、開花後も
芽の展開が起これないというdad1突然変異体と同様の表
現型が観察された。ジャスモン酸処理による展開能の回
復も観察された。これらの個体では、X-Glucによる染色
も弱くなる傾向が見られた。

(0045) [実験例7] DAD1連伝子ベクターを用いた
サザンハイブリダイゼーション (図8)

シロイタナズナ以外の植物種のゲノムDNA中にもDAD1連
伝子と類似の遺伝子が存在するの調査するために、

SEQUENCE LISTING

<110>: Research Institute of Seed Production Co., Ltd.

<120>: YAKU NO REIKAI NI KANVOSURU IDENSHI

<130>: P99-0082

<160>: 3

<170>: Patent In Ver. 2.0

<210>: 1

<211>: 8133

<212>: DNA

<213>: Arabidopsis thaliana

<220>:

<221>: CDS

<222>: (3487) ..(4827)

<400>: 1

agctctttt attaccnaat taagaalaa tccaacaa ttcattttg catgtaact 60
taagtcact attcctbaa ttaattaca cnaattgca gtagtgta tgaatgtt 120
tgaatcttt attcctctt agattatc ttaagatca accittgtt tgaatatt 180
cgttgtag cgttgtag taaactac aattctatc agaccatga gtccatrat 240
ttcccatg ccttagaa accittagt algaatbaa aacatcca actaactag 300
tatagatg agaaanaat ttaanaat tattctcat taittcat cagatttt ggaanaat 360
aattcatc aatcattga alagtgcca tatataac cactattg ttaattgaa 420
caattctt aatattgt ttgtttgaa tattctata aactataga aatttgata 480
ttatctgtt gaaatgaac gtaatttat tatataga ccgatata aatagtag 540

tagtaagt attgaacac aattgacac caaagaag ttgttagctg gctctgatg 600

gttaacgac taagtatga cttatcag cgcacaga tactgttagc ttgttagt 660
cacttttt tttttttt caacaalg aatagctg ttaagaaga cttattgtt 720
agctactac atacttcat tcaattgtt tatattagc atgtagaaa ctaatatg 780
aaatgtgac gaatgagc taacacagc ggaatagc agtaaatata gttataat 840
tttataacc clattaga gaagtga ttgttttt ttgttagc tgaattgtt 900
ttatattg aatatttat actgataa actataact atagtatbaa gtagattgt 960
ctctcttgc cttttttt tatttcaaga agtagtact agtatatbaa gttttactg 1020
taatttagtt ttgttagt atagaana ctagtagaa aactctact aagtatata 1080
gagataga aatagaat tcaatgta gttatgta tgaattagt gtagataga 1140
taccataat atttagtt aagaatct actaacga gccaatgac aagctagct 1200
atatattat cactctgta aactaact ttcttaca tgaatctct aactttgtt 1260
cagttcact tacaactc aatatata gactgggtt agttcttba aaaaatcaa 1320
cctgataca agttagtc atgctatga cttcatctt cttgttgc cttctttaa 1380
attactctc taatttct ttgttatga aagaanaa acttttaac gttttccta 1440

aaacgtgga caatgctc cgaagaaga aatgccaat gaaatgata tgaatagt 1500
ccctcagaa aaagagtag aagaatata cattataag aaccaatba tgcctttgt 1560
gcttttagt attgttcca caaatatg aatgttagc ttgtttgt atatacaaa 1620
cgaatcatt taatcagga aatgtaga aatgtagt ctaacact agtttaaga 1680
tggtagac aattttgt tattcaaaa caagaattt gtccaatc gattagaaca 1740
ccaactcatt taattgtt aactgtt atgtatttc taacgaagc attttcagc 1800
cgttcactg gactctc ctagtactc atgtttatc gtagaatta aactcttt 1860
cttcaatga gttcagtc tacaatc ttitttagc atataacta taattttgt 1920
taagaatga aagaatcaa agtttttta ttactagt cccacgtgga taactttga 1980
aatgctta aacagtag taatgaaa tgccttaag tatatagc taacacagc 2040
tttcaaat cagatgtt atcaatcaa tataaaga atattgcaa acagctaga 2100
cttcaatg atttaaat gaaagagc tataattgt taaaagac aagaatata 2160
tataagac tacaatgt gattgaat tcaatagta agtaactac attcacttc 2220
ttttatgt cgtttgtccc gaacacaca tcaatcaac ttatttaatt ggaactatc 2280
tgttaacgc gatatagc agcaatgaa attcaatc gactttat cttgtatga 2340

tttgcctta ttaatgag taatcaacc attctgct catttgata tgaatatta 2400
cacttaatt ttatttag attcaatgc gataactat tttaagatt ttatattgt 2460
ctttatag tagacataa acttgctgt aattgata aacaatag clagaact 2520
agaagagc agaatatag gattgata cttgactt tcttgaga ttaaatca 2580
gcaatgag gcaatagc aaacgcaa gtaacatc cagcgaat gacagagc 2640
gagtagta tagttctca cgttcaag cctttcag cgtttgtt tgaacttc 2700
cagtgaca tctcactga aacagagc cagatttta ttgataca cacttttc 2760
tcttctca tctcactg cgtcattc tcttagctc attatcac atttactt 2820
tttttttt ttgttacc aattgata aacttttt ttittgata tataagtc 2880
attanaag agatgaana cgtatgca aaaaacac taataacta gaaacttc 2940
atgaacca attattgt cactttgt ttatgctca tttagttaa gtaanaaa 3000
gaagagca actagctta tgttaccac aatcatit atagattt gaaacttgt 3060
caagattgt actcttct catagata aatatacaa cccagattt atagcttc 3120
taattgtta cattttgc ttatcatag acgaacta cttgaatcc tatataca 3180

aacagatcc aatgtgtga ttgttagt agatanaa tcaatact atataagc 3240
tgttcaact tttagagc gactcttc attttcaaa atcttttaa cttcatata 3300

gatcccaat tttctacta taagaagac caatttctc tttcttcaa tcaatttat 3360
 tttctaccc aaatctact tcaagactc aacatctcc attctctata tacaacttt 3420
 ttaagaac ttgatatt cagaatcaat attataaat taagaacac aacactttc 3480
 tcaaca atg aga ttc tct ctt tct ccc gta cgt ccc cat agt gta gta 3528
 Met Arg Phe Ser Leu Ser Pro Val Arg Pro His Ser Val Val
 1 5 10
 gta cct tca cta cca aac cag gac gtc gtt tct tat ata agt agt acg 3576
 Val Pro Ser Leu Pro Lys Gln Asp Val Val Ser Tyr Ile Ser Gly Thr
 15 20 25 30
 acg tgg aat cat caa tgt cga tgt gta ctt aca ctt cct tct cct tea 3624
 Thr Ser Asn Arg Gln Cys Arg Cys Val Leu Thr Leu Pro Ser Pro Ser
 35 40 45
 gtt tcc act tcc cga cca ccc gtt tta ccc aac cag gaa acc tgg gag 3672
 Val Ser Thr Ser Arg Pro Pro Val Leu Pro Lys Pro Glu Thr Trp Glu
 50 55 60
 agt ttg ctg cta aac cat gat caa att cca agc gaa ttc tca ccc act 3720
 Ser Leu Leu Leu Asn His Asp Gln Ile Pro Gly Glu Phe Ser Pro Thr
 65 70 75
 ggt tgg agt atc ccc gtt gtt agc cgg aga tgg atg gag tat cag 3768
 Gly Ser Ser Ile Pro Val Lys Leu Gly Arg Arg Trp Met Glu Tyr Gln
 80 85 90
 ggg ctt caa aat tgg gac ggt ctt tta gac cca ttg gac gac aat ctc 3816
 Gly Leu Gln Asn Trp Asp Gly Leu Leu Asp Pro Leu Asp Asp Asn Leu
 95 100 105 110
 cgg cga gag att ctc cgg tac ggt caa ttt gtc gaa tgg gct tat caa 3864
 Arg Arg Glu Ile Leu Arg Tyr Gly Gln Phe Val Glu Ser Ala Tyr Gln
 115 120 125
 gca ttt gat ttc gat cct tcc tct cca acc tac ggg aca tgc cgg ttt 3912
 Ala Phe Asp Phe Asp Pro Ser Pro Thr Tyr Gly Thr Cys Arg Phe
 130 135 140
 ccg agg agc acg ttg tta gag cga tcc ggt tta ccc aac tcc ggt tat 3960
 Pro Arg Ser Thr Leu Leu Glu Arg Ser Gly Leu Pro Asn Ser Gly Tyr
 145 150 155
 cga cta acg aag aac ctt cgt gcc acg tca ggt att aac ttg cca cgt 4008
 Arg Leu Thr Lys Asn Leu Arg Ala Thr Ser Gly Ile Asn Leu Pro Arg
 160 165 170
 tgg att gag aag cga cca agc tgg atg gct aca caa tct agc tgg att 4056
 Trp Ile Glu Lys Ala Pro Ser Trp Met Ala Thr Gln Ser Ser Trp Ile
 175 180 185 190
 ggt tac atg gta gtt tgc cag gac aca gaa gag atc tgc cgg ctt ggg 4104
 Gly Tyr Val Ala Val Cys Gln Asp Lys Glu Glu Ile Ser Arg Leu Gly
 195 200 205
 cgt aga gac atc atc tcc ttc cgt gga acc gcc agc tgt ctc gag 4152
 Arg Arg Asp Val Val Ile Ser Phe Arg Gly Thr Ala Thr Cys Leu Glu
 210 215 220
 tgg tta gag aac ctt cgc gcc acg ctg act cat ctc cct aat ggg cct 4200
 Trp Leu Glu Asn Leu Arg Ala Thr Leu Thr His Leu Pro Asn Gly Pro
 225 230 235

act gga gca aat cta aac ggg tct aac tct ggg ccc atg gtt gag agc 4248
 Thr Gly Ala Asn Leu Asn Gly Ser Asn Ser Gly Pro Met Val Glu Ser
 240 245 250
 ggg ttt tta agc ttg tat act tca ggt gtt cec cec ttg aga gac atg 4296
 Gly Phe Leu Ser Leu Tyr Thr Ser Gly Val His Ser Leu Arg Asp Met
 255 260 265 270
 gta aga gaa gag atc gca agg cta ctc caa tct tac agc gac gag cgg 4344
 Val Arg Glu Glu Ile Ala Arg Leu Leu Gln Ser Tyr Gly Asp Glu Pro
 275 280 285
 tta agt gta acg ata acc ggt cac agc ctc ggc gct agc atc ggc aca 4392
 Leu Ser Val Thr Ile Thr Gly His Ser Leu Gly Ala Ala Ile Ala Thr
 290 295 300
 cta gca gct tac gat atc aaa acg acg ttt aaa cgt ggc cct atg gtt 4440
 Leu Ala Ala Tyr Asp Ile Lys Thr Thr Phe Lys Arg Ala Pro Met Val
 305 310 315
 acc gta ata tct ttc gga ggt cca cgt gtc gga aac aga tgc ttt cgg 4488
 Thr Val Ile Ser Phe Gly Pro Arg Val Gly Asn Arg Cys Phe Arg
 320 325 330
 aaa ctc ctt gag aag caa ggc acg ggt cta aga atc gtc aac tcc 4536
 Lys Leu Leu Glu Lys Gln Gly Thr Lys Val Leu Arg Ile Val Asn Ser
 335 340 345 350
 gag gac gtc atc acc aaa gtt cct gga gtt tta gaa aac aga gag 4584
 Asp Asp Val Ile Thr Lys Val Pro Gly Val Leu Glu Asn Arg Glu
 355 360 365
 caa gat aac gtt aag atg aca ggc tgc ata atg ccc agc tgg ala cag 4632
 Gln Asp Asn Val Lys Met Thr Ala Ser Ile Met Pro Ser Trp Ile Gln
 370 375 380
 aga cgc gtc gag gag acg cgg tgg gtt tac gct gaa atc ggt aag gag 4680
 Arg Arg Val Glu Glu Thr Pro Trp Val Tyr Ala Glu Ile Gly Lys Glu
 385 390 395
 ctt cgg ctg agt agc cgt gac tgc ccc ccc ttg agc agc atc aat gtc 4728
 Leu Arg Leu Ser Ser Arg Asp Ser Pro His Leu Ser Ile Asn Val
 400 405 410
 gcc acg tgt cat gag ctg aca acg tat tta cat ttg gta gag ggg ttt 4776
 Ala Thr Cys His Glu Lys Thr Tyr Leu His Leu Val Asp Gly Phe
 415 420 425 430
 gtc agc tcc acg tgt cca ttc aga gaa aca gct cgg aga gtt ctc cat 4824
 Val Ser Ser Thr Cys Pro Phe Arg Glu Thr Ala Arg Arg Val Leu His
 435 440 445
 aga tgaattcca tgaatcgc attcgttaact aatttaattt tggcaaga 4877
 Arg
 aacatcaaac caggagaaa atcaagacc gcgtacgggt tgaattcgtt taacaata 4937
 atttcgtgac atactctaa cttagcggtt gaattagaaa agaagtaaaa gtagaaga 4997
 gctctaaagg gcgaattgtt aaaaatgtat tgaatcgtt ataactctaa attgittala 5057
 tactgtatag tgtitttttaa aaaaattgcc agtaattatg aaaaatggt cataatcat 5117
 aaaaatttgt cgcacagca tggctactaa aaactcttaa agcgttaant tgccttaact 5177
 tggacagaaa aggaagtga aagacaaaaa tgcctctatc tccgtccaaa tatagaant 5237
 gggaaagccc caatgatggt gccacgaag caccagcct tgaagaagt taactgac 5297
 tctgtacttg gcaaaaagc ttaaaagatt cagttgttg caaatctga atgccaatg 5357
 agaacagca tcatgcgcg tcaatttatt taccgtatag tatttacttt cctgttacc 5417

aggaanaic accatcaag catattittg tggggtgc atgtctgt tgtttttaa 5477

ctctccaa aagttgttt tatctacg tactactag aagaccata aataatgc 5537
caanaatg gatatagt tctcgata atgtttatt ctatgata taaagcaa 5597
actagtgc acttcatgt gataat atagataa tttttataa gaaataga 5657
tatttcaa taattatatt atttataat gtagttaa catataca tggttatg 5717
gctagaga aatacattt tcatgttt tgtatata ttaagata aacatctc 5777
acttaact atctatata tttatttt tatttttaa tattgttt ttattttaa 5837
abaaaatt cagacatg tatataca aataatctt taaaacac aaaaattat 5897
catgaagc gaaggttaa taagaaga tttttttt tttgtgtg gttaaata 5957
tgcagact taagataat attatagt catgaatt agatagtt ttattttt 6017
catatagc ttcttctt tctaaaag aaacactta actgaagt gacgaac 6077
gtcagcat actgtttt cgtgactg aagggaga tatatcat gaaatgac 6137
aagcgata cgtacata caggacgc gtagctaa atatatgc acaaatga 6197
abagatga taccacca taccataat ctgacttg aactataa tggtttga 6257
aagtaact catgtatc atgttgtt actttgtg accaacca ttctgtcc 6317
aaaaatcat caaatgga gacgcaca tattttat tatttaatt atattgaag 6377

gtttatatt ttcttctg gtacattct ctctgttt ctctatgt ttaagtga 6437
ttaagagt caataaga tgaattac cttttcat ttctgtatt tggaaact 6497
cagttgat acatctgc accatttt agtatatt aacaaaaa gaatttga 6557
aaaatatt tatcggtg actttttg ttctgtg catttttc caactgt 6617
caaaatt accatga atattagt atttaggt agtatatt tacaatga 6677
tgcacata gtagcata ctggacct taaggtgc atgtatga tataggaat 6737
cagacact ttagcaaa aaaaaag aaaaaaa gaatacag accatcaa 6797
aaatatt ctctatc atagtatt atactaaa ttaattta aatataat 6857
tattgtatt aaaaatga gtctacag abatacag aaatattt aagtacaa 6917
tttagca taatata agttttaa atataaga tttaataca aaacttat 6977
aaagtatt gtagcgt ttagcata abataat catgatca aattgtatt 7037
aatittac gtaactgt gaataagt aatttcta aaatttca taatttcat 7097
tttaaggt tatgaagt agtatatt tctcataa acttgtata atgtattat 7157
aagatatt tctaaaag acaatatt tactttgt gtagcaca aactaacta 7217

cgttgata actgtatc tacaaggt atactatt aattatcat tacaatatt 7277
gaaaaggt tacttaaca atcaaat atataaat ccaaaagt ttatcact 7337
cttttaatt taagtttta ctgaatcat gtagatatt catatcata caattgtat 7397
ctgaagatt ttagcagct tttagaag gacaaaca gctacgca tggagacc 7457
agaaaatg atatttatt abataat ggtttttt gtagtaag aacgaag 7517
tgaacaga gataatc ataatctt ctattata atttaacta ttcttcta 7577
attatnac aatttga catcagca atgttaact atgtactat aagcaatg 7637
taatactca atagattt ttitttga atcgcata tatataga taataaga 7697
catataga cttttgac atataaa aataataa tttagcaaa taataaga 7757
aagaaag agaaatgt atgttgtt gtaggtg atgtttat gcttctca 7817
tctaacatt gacaaatt gcgtgccc aacacacc caaaaga tagtcaaa 7877
ttaataat caatagat cctatctc ctacccaac tctacttc atttactc 7937
catgact tttagtca ttaatttatt taattataa atattttt taatgaatt 7997
tgaagac tgtgtgat ataaataa tgggtgac tattaagt caaataga 8057
aagtaatt taactcaa ttaattca acataga ttaattatt tttttttt 8117

caagttca cgtacg

8133

<210>: 2
<211>: 447
<212>: PRT
<213>: Arabidopsis thaliana
<400>: 2
Met Arg Phe Ser Leu Ser Pro Val Arg Pro His Ser Val Val Val Pro
1 5 10 15
Ser Leu Pro Lys Gln Asp Val Val Ser Tyr Ile Ser Gly Thr Ser
20 25 30
Asn Arg Gln Cys Arg Cys Val Leu Thr Leu Pro Ser Pro Val Ser
35 40 45
Thr Ser Arg Pro Pro Val Leu Pro Lys Pro Glu Thr Trp Glu Ser Leu
50 55 60
Leu Leu Asn His Asp Gln Ile Pro Gly Glu Phe Ser Pro Thr Gly Ser
65 70 75 80
Ser Ile Pro Val Lys Leu Gly Arg Trp Met Glu Tyr Gln Gly Leu
85 90 95
Gln Asn Trp Asp Gly Leu Leu Asp Pro Leu Asp Asn Leu Arg Arg
100 105 110
Glu Ile Leu Arg Tyr Gly Gln Phe Val Glu Ser Ala Tyr Gln Ala Phe
115 120 125
Asp Phe Asp Pro Ser Ser Pro Thr Tyr Gly Thr Cys Arg Phe Pro Arg
130 135 140
Ser Thr Leu Leu Glu Arg Ser Gly Leu Pro Asn Ser Gly Tyr Arg Leu
145 150 155 160
Thr Lys Asn Leu Arg Ala Thr Ser Gly Ile Asn Leu Pro Arg Trp Ile
165 170 175
Glu Lys Ala Pro Ser Trp Met Ala Thr Gln Ser Ser Trp Ile Gly Tyr
180 185 190
Val Ala Val Cys Gln Asp Lys Glu Ile Ser Arg Leu Gly Arg Arg
195 200 205
Asp Val Val Ile Ser Phe Arg Gly Thr Ala Thr Cys Leu Glu Trp Leu
210 215 220
Glu Asn Leu Arg Ala Thr Leu Thr His Leu Pro Asn Gly Pro Thr Gly
225 230 235
Ala Asn Leu Asn Gly Ser Asn Ser Gly Pro Met Val Glu Ser Gly Phe
240 245 250 255
Leu Ser Leu Tyr Thr Ser Gly Val His Ser Leu Arg Asp Met Val Arg
260 265 270
Glu Glu Ile Ala Arg Leu Leu Gln Ser Tyr Gly Asp Gly Pro Leu Ser
275 280 285
Val Thr Ile Thr Gly His Ser Leu Leu Ala Ile Ala Thr Leu Ala
290 295 300
Ala Tyr Asp Ile Lys Thr Thr Phe Lys Arg Ala Pro Met Val Thr Val
305 310 315 320
Ile Ser Phe Gly Gly Pro Arg Val Gly Asn Arg Cys Phe Arg Lys Leu
325 330 335
Leu Glu Lys Gln Gly Thr Lys Val Leu Arg Ile Val Asn Ser Asp
340 345 350

Val Ile Thr Lys Val Pro Gly Val Val Leu Glu Asn Arg Glu Gln Asp
355 360 365

Asn Val Lys Met Thr Ala Ser Ile Met Pro Ser Thr Ile Gln Arg Arg
370 375 380

Val Glu Thr Thr Pro Thr Val Tyr Ala Glu Ile Gly Lys Glu Leu Arg
385 390 395 400

Leu Ser Ser Arg Asp Ser Pro His Leu Ser Ile Asn Val Ala Thr
405 410 415

Cys His Glu Lys Lys Thr Tyr Leu His Leu Val Asp Gly Phe Val Ser
420 425 430

Ser Thr Cys Pro Phe Arg Glu Thr Ala Arg Arg Val Leu His Arg
435 440 445

<210>: 3

<211>: 3422

<212>: DNA

<213>: Ambidopsis thaliana

<220>:

<221>: promoter

<222>: (1) .. (3422)

<400>: 3

aagctcttt attaccat taagtaata tccaacaa ttcattttg catgaact 60
taagtaatt attccttaa ttaattaca caaattga gtagtatta tgaattgt 120
tgaatttt attcctct agattatc ttaagata accttttgt tgaatttt 180
cgtttatg cgtttgaa tatatttc attcttalc agaccatga gtagatcat 240
ttcccaat cctttaga caatttgtt algaataaa acactccga atactagc 300
tattagatt agaaaat taaatat tatgtcat cacatttt gaaaatat 360
aalactat aatcattt atgtccca tatatagc cacattttg ttaattga 420
cuaattgt aatattgt ttgtttga tatattata acatagaga aattgata 480
tatctgtt gaataaac gtatttat tatataga ccatatca aatagtag 540
tagtaatt atgaacac aattgacac caaagaag ttgtatcg gctttgat 600
gtttacgc tgaataga cttatcga cgtccaga tactttgc ttctttgt 660
cacttttt ttittttta caaanaag aatattgc ttaagaaga ctctattgt 720
agctaac alactattt tcaattgt tatattgc atgtaga cttatgat 780
aaattgac gaatgacc taacacag ggaatgac agtaataa gttaatt 840
ttctaac cttatcga gaagtga ttgttttt ttgtccag tgaattgt 900
ttatattg aatattat aatgata actataact atattata gttattgt 960
ctcttttc cttttttt tttttaga atgtattgt aattatata gttttatg 1020
taataatt ttgtatgt alagaat cgtataga actatatt aattatata 1080
gaacataga aataaagt taaatga gttatga tgaattgt gtagatga 1140
taccataat atatttgt aatattat actaacga gaccatgc aagatgt 1200
atattatt cactgta actaaact ttcttaca tgaatttc aattttgt 1260
cgtttcatt tacaatat aattatga gattggtt agtttttc aanaatca 1320
catcatca agttatgc atgtatca ctctattt ctctttgc cttcttata 1380
attactct taattttt ttgtatga aagaat acttttat gtttttgt 1440
acaattga caaattgc caaagaaga aatgcaat gtaataa tgaattgt 1500
ccatcaga aagaatga aatataa cttataag aactataa tgcattgt 1560
ggttttgt attgttca caatattg aatgacg ttgtttgt atactataa 1620
catgactt taatcgga aatgata aatgctgt caataact agtttaag 1680
tggatgac aattttgt tatataaa caaanaat gtccatc gatgaga 1740

ccaatcact ttaattgt aagcattg atgtattcc taagaagac attttccag 1800
gtttcattg gttcttcc ctgattat atgtttatc gtaataa aactcttt 1860
cttaagta gttatgac tacaattc ttittactg atatacata taattttg 1920
taagataa agattata agttttta ttactagt ccaatgag taactttga 1980
aatgattca aagatgta taatgaa tcttaaaag tatataag taacactg 2040
ttttcgaat cactgatt atcaataa taaagaaa atattgaa acgtatga 2100
ctctaaag attataat gaagaagc tatattgt taaagcac agactata 2160
tataaagc taccatgt gatgaat tcaataga agtaactc gttacttc 2220
ttttatgt cgtttgcc gaacacaa tcttccac ttattatt gacttttc 2280
tgtttccg gatattgt agaatata attttatc gactttat actttatca 2340
ttttctta ttcaatgt tttttacc atttttgt cattttga tttattta 2400
cactacatt ttatttat attttatg gataact ttaagatt ttattttg 2460
ctttttatg tagactaa acttttgt aattttta aaactatg ctatagct 2520
agaagcgt ggaataga gagttata ctcttctt tctttgaga tcaattca 2580
gaattgag ggaatgt aagcgaag gttttgag cgtattgt tgaacttc 2640
gaactgga ttttttca cgtttcag cttttgag cgtattgt tgaacttc 2700
cactttca gttttcga aagcagct cgtattta ttctttca cacttttc 2760
ttttttta tttttcga cgtttcag cgtttcag ttattttt attttttt 2820
tttttttt ttgtttcc aatttttt aatttttt ttittttta tttttttt 2880
atataaag agattata cgtttgta aaacacaa taataact gatttttc 2940
atgtttca atattgt ttttttca aattttca ttattttt gttttttt 3000
gaagaaca actattca ttgtttcc aatttttt attttttt gttttttt 3060
caatattgt actatttt tatataaa aattataa ccaatttt ttattttt 3120
taattttgt cattttgc ttattttc agtaataa ctgaaatc ttattttt 3180
aagatttca aattttta ttgtttgt agataaat tttatttt atataact 3240
tttttttt tttttttt ttgttttt ttgttttt tttttttt tttttttt 3300
gatttttt tttttttt tttttttt tttttttt tttttttt tttttttt 3360
tttttttt aatttttt ttgttttt ttgttttt tttttttt tttttttt 3420
tt

【図面の簡単な説明】

【図1】T-DNAタギングに使用した遺伝子導入ベクター

の図。

【図2】野生型 (WS) およびDad1突然変異体の花および

葎の形態を示す写真。

【図3】Dad1遺伝子クローニングの概要を示す図。

【図4】相補性試験に用いた遺伝子導入ベクターの構造

を示す図。

【図5】アンチセンスDAD1遺伝子植物導入ベクターの構

造を示す図。

【図6】アンチセンスDAD1を形質転換したシロイヌナズ

ナの花および葎の形態を示す写真。

【図7】プロモーター-GUS遺伝子導入ベクターの構造

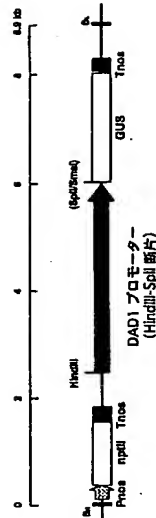
を示す図。

【図8】DAD1遺伝子をプロンプにしたサザンハイブリダ

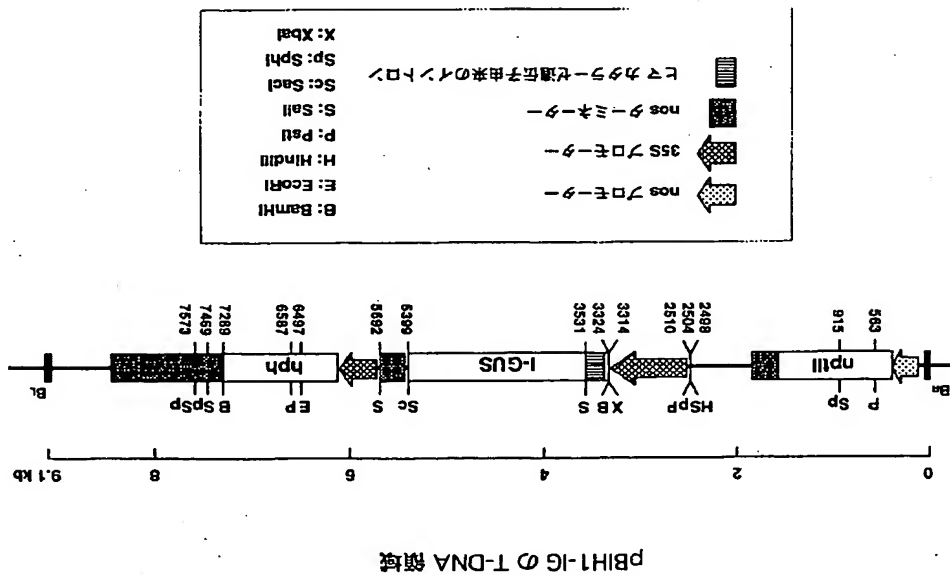
イゼーションの結果を示す図。

【図7】

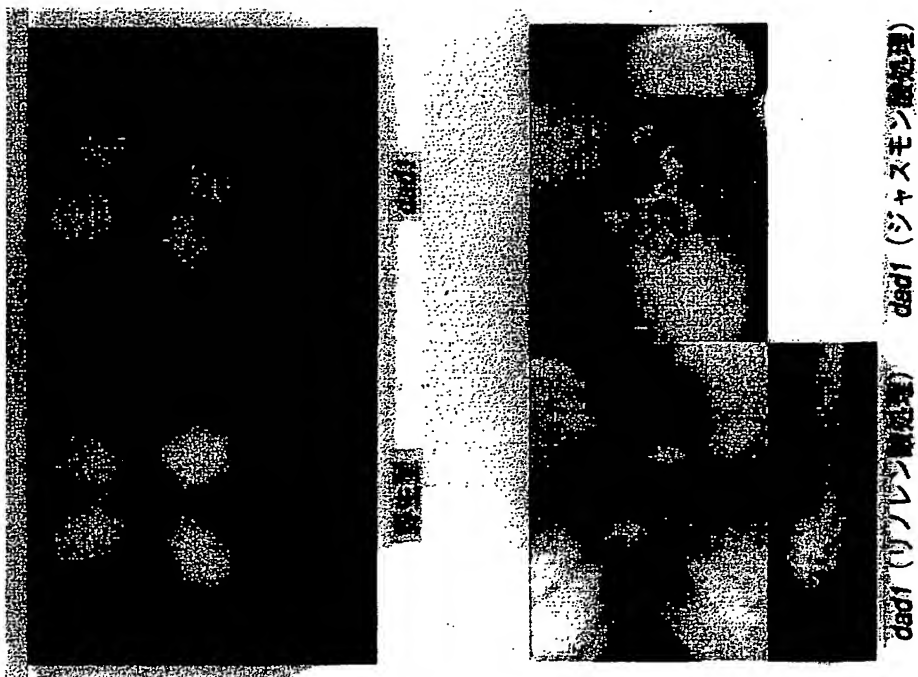
pDAD1-HのT-DNA 構造



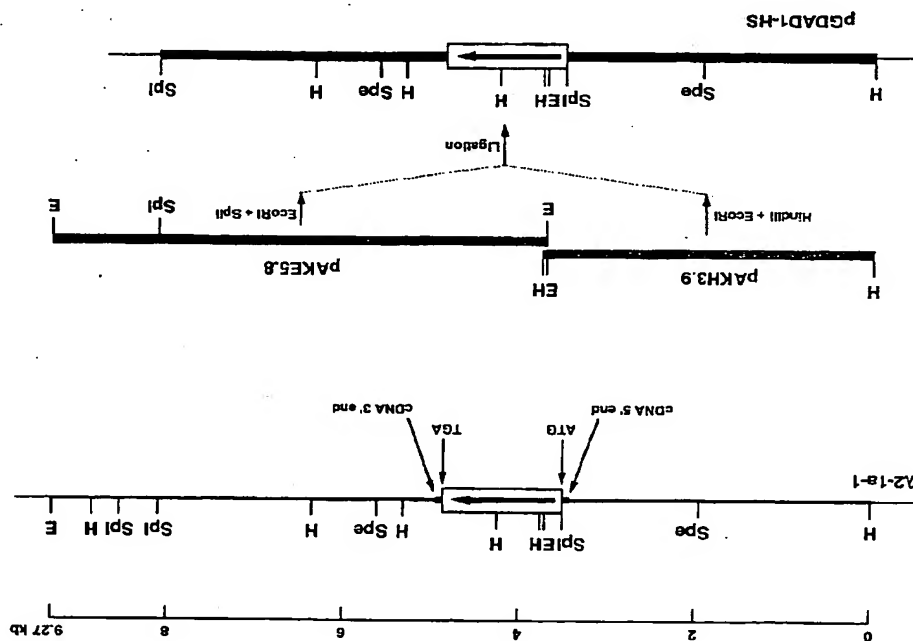
【図5】



【図6】



【図3】



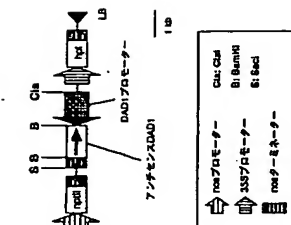
【図4】

pTAD1-SSのT-DNA領域



【図5】

pADAD10T-DNA領域

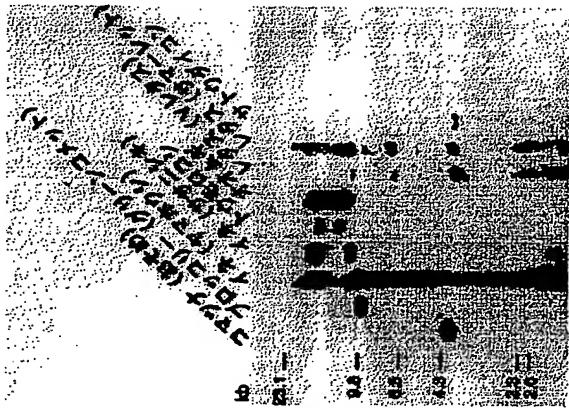


【図6】



アンチセンス RNA 発現子を導入した細胞 (細胞画像) アンチセンス RNA 発現子を導入した細胞 (ジャスモン細胞画像)

(図8)



(72)発明者 小田 明子
愛知県岡崎市明大寺町西須中38番地 岡
崎国立共同研究機構基礎生物学研究所
Fターム(参考) 28030 AA02 AB03 AD20 CA07 CA08
CA17 CA19 CB02 CD06 CD13
CD14 CD17 CD01 HA01
4B024 AA08 BA80 CA04 EA04
4B065 AA88X AA88Y AB01 BA16
CA24 CA53

【手続補正書】	
【提出日】平成12年6月16日(2000.6.1	【手続補正2】
6)	【補正対象書類名】明細書
【手続補正1】	【補正対象項目名】請求項2
【補正対象書類名】明細書	【補正方法】変更
【補正対象項目名】請求項1	【補正内容】
【補正方法】変更	【請求項2】 以下の(a)又は(b)に示すDNA
【補正内容】	(a)配列番号2に記載のアミノ酸配列により表されるタ ンパク質をコードするDNA
【請求項1】 以下の(a)又は(b)に示すDNA	(b)配列番号2に記載のアミノ酸配列において1若しく (a)配列番号3に記載の塩基配列により表されるDNA は複数のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたア ミノ酸配列により表され、薬の発現を制御する機能を有 するタンパク質をコードするDNAであって、(a)のDNA に、部位特異的変異誘発法によって変異を生じさせるこ とにより得ることのできるDNA
(a)配列番号3に記載の塩基配列により表されるDNA (b)配列番号3に記載の塩基配列において1もしくは複 数の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列に より表され、プロモーター活性を有するDNAであって、 (a)のDNAに、部位特異的変異誘発法によって変異を生じ させることにより得ることのできるDNA	

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷ F1
C12R 1:91) テーワード(参考)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.